

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 63248394
PUBLICATION DATE : 14-10-88

APPLICATION DATE : 06-04-87
APPLICATION NUMBER : 62083998

APPLICANT : KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD;

INVENTOR : HAGIWARA TAKESHIGE;

INT.CL. : C12P 19/40 C12N 1/20 C12N 15/00 C12P 19/32 // (C12N 1/20 , C12R 1:185),
(C12N 1/20 , C12R 1:15), (C12N 1/20 , C12R 1:13)

TITLE : PRODUCTION OF NUCLEIC ACID-RELATING SUBSTANCE

ABSTRACT : PURPOSE: To obtain a nucleic acid-relating substance in high efficiency at a low cost, by culturing a microbial strain belonging to Corynebacterium genus or Brevibacterium genus and containing a recombinant DNA of a vector DNA and a DNA fragment containing gene of APTase.

CONSTITUTION: A microbial strain belonging to Corynebacterium genus or Brevibacterium genus is transformed with a recombinant DNA derived from (A) a DNA fragment containing gene (hereinafter called as purF) of amidophosphoribosyl transferase (APTase) which is an enzyme participating in biosynthesis of purine nucleotide, preferably a DNA fragment containing purF originated from bacterium belonging to Escherichia genus, Corynebacterium genus or Brevibacterium genus and (B) a vector DNA which can be proliferated in bacterial cell of Corynebacterium genus or Brevibacterium genus by autonomous replication. The obtained transformant is cultured in a medium to obtain nucleic acid-relating substances such as inosine, 5'-inosinic acid and 5'-xanthyllic acid.

COPYRIGHT: (C)1988,JPO&Japio

BEST AVAILABLE COPY

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A)

昭63-248394

⑫ Int.Cl.

識別記号

厅内整理番号

⑬ 公開 昭和63年(1988)10月14日

C 12 P 19/40
C 12 N 1/20
15/00
C 12 P 19/32
#(C 12 N 1/20
C 12 R 1:185)
(C 12 N 1/20
C 12 R 1:15)
(C 12 N 1/20
C 12 R 1:13)

7236-4B
8515-4B
A-8412-4B
7236-4B

審査請求 未請求 発明の数 3 (全9頁)

⑭ 発明の名称 核酸関連物質の製造法

⑮ 特願 昭62-83998

⑯ 出願 昭62(1987)4月6日

⑰ 発明者 藤尾 達郎 神奈川県相模原市相模台6-29-1
⑱ 発明者 勝亦 瞳一 東京都町田市成瀬2-12-3 ポプラ丘コープ6-401
⑲ 発明者 萩原 健茂 東京都町田市成瀬台2-32-3 ポプラケ丘コープ20-
406
⑳ 出願人 協和酵素工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

明細書

求める範囲第1項記載の製造法。

(4) エシェリヒア属、コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属する微生物のアミドフォリボシル・トランスフェラーゼの合成に関与する遺伝情報を担うDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNA。

(5) エシェリヒア属、コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属する微生物のアミドフォリボシル・トランスフェラーゼの合成に関与する遺伝情報を担うDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNAを保有し、コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属し、かつ核酸関連物質を生産する能力を有する微生物。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明はプリンヌクレオチド生合成に関与する酵素であるアミドフォリボシル・トランスフェラーゼ (EC2.4.2.14、以下APTaseと称することもある) の合成に関与する遺伝子を含

1. 発明の名称

核酸関連物質の製造法

2. 特許請求の範囲

(1) 微生物のアミドフォリボシル・トランスフェラーゼの合成に関与する遺伝情報を担うDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNAを保有し、コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属し、かつ核酸関連物質を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養物中に核酸関連物質を生成蓄積させ、該培養物から該核酸関連物質を採取することを特徴とする核酸関連物質の製造法。

(2) 该DNA断片がエシェリヒア属、コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属する微生物から得られるDNA断片であることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の製造法。

(3) 该核酸関連物質がイノシン、イノシン酸またはキサンチル酸であることを特徴とする特許請

特開昭63-248394(2)

むDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNAを用いて、コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物を形質転換し、得られる形質転換株を培地に培養し、培養物中にイノシン、5'-イノシン酸、5'-キサンチル酸などの核酸関連物質を生成蓄積させ、該培養物から該核酸関連物質を採取する核酸関連物質の製造法に関する。

核酸関連物質は、調味料、医薬品原料として有用であることから、本発明は食品および医薬品工業の分野に属する。

従来の技術

核酸関連物質の製造法としては、リボ核酸を分解する方法、発酵生産した前駆物質を合成法により目的物質に変換する方法、微生物により直接発酵生産する方法などが知られている。発酵法で核酸関連物質を生産する方法については、野生株から誘導された突然変異株を用いる方法が知られている。たとえば5'-イノシン酸生産性変異株（特公昭58-46319）、5'-キサンチル酸生産

性変異株（特開昭60-156399）などを用いる方法が知られている。

発明が解決しようとする問題点

従来法によるイノシン、イノシン酸、キサンチル酸などの核酸関連物質の生産は必ずしも満足すべきものではなく、調味料、医薬品原料として重要なこれら核酸関連物質をより高収率で安価に製造する方法の開発が望まれている。

問題点を解決するための手段

本発明者は微生物を用いる核酸関連物質の生産において、従来の突然変異の付与による育種とは全く異なる、組換えDNA技法による核酸関連物質生産菌株の育種方法について研究を重ねた。その結果、核酸関連物質の生合成に係る酵素であるAPTaseの遺伝子（以下purFと略記することがある）を含むDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNAを保有させた菌株が核酸関連物質の高い生産性を有することを見い出し、本発明を完成するに至った。

以下に本発明を詳細に説明する。

本発明は、微生物のAPTaseの合成に与する遺伝情報を担うDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNAを保有し、コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、かつ核酸関連物質を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養物中に核酸関連物質を生成蓄積させ、該培養物から該核酸関連物質を採取することを特徴とする核酸関連物質の製造法を提供する。

該核酸関連物質としては、イノシン、イノシン酸またはキサンチル酸などがあげられる。

本発明に用いるAPTaseの遺伝子(purF)を含むDNA断片としては原核生物、バクテリオファージまたはプラスミドに由来するものが用いられるが、なかでも細菌特にエシエリヒア属、コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する細菌由来のpurFを含むDNA断片が好適に用いられる。具体的には大腸菌K12株の染色体DNA由来のpurFを含むDNA断片があげられる。

本発明に用いるベクターとしてはコリネバクテ

リウム属またはプレビバクテリウム属菌種内で自律増殖できるものであればいずれも用いることができる。具体的にはpCG1、pCG2、pCG4 pCG11、pCE52、pCE53、pCE54などが好適に用いられる。これらベクターについては特開昭57-134500、特開昭57-183799、特開昭58-35197、特開昭58-105999、特開昭58-126789、特開昭59-156292にそれぞれ記載されている。

purFを含む供与体DNAとベクターDNAとの組換え体DNAは、試験管内で両DNAを制限酵素で切断した後、DNAリガーゼで再連結反応した後、この結合反応混合物を用いて、purFを欠失したコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属菌種を形質転換し、欠損形質が補された形質転換株を選択することによって得ることができる。コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属菌種で直接組換え体DNAを選択するかわりに、たとえば大腸菌のような既に遺伝子組換え技法が確立している宿主-ベクター系

特開昭63-248394(3)

を用いて *purrF* を分離し、しかる後にコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属菌種にてこの分離遺伝子を発現させることもできる。すなわち、*purrF* の供与体 DNA を、大腸菌とコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属菌種とのシャトルベクター DNA と試験管内で結合反応させ、この反応混合物を用い、*purrF* が欠損した大腸菌の変異株を形質転換する。ついで、欠損形質が相補された形質転換株を選択し、この形質転換株から組換え体プラスミドを単離する。この組換え体プラスミドを用いてコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属菌種を形質転換し、形質転換株を選択分離することによっても目的とする組換え体 DNA を取得できる。大腸菌とコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属菌種とのシャトルベクターとしては *pCE52*、*pCE53*、*pCE54* などが使用できる。

本発明の宿主微生物としては、コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し DNA 取込み能を有する微生物であれば、野生株の他に

染色体 DNA の相同性が明らかに異なる (インターナショナル・ジャーナル・オブ・システムティック・バクテリオロジー (Int. J. Sys. Bacteriol.) 31, 131, (1981)) ため、従来の遺伝子組換え技術においては、宿主微生物としては利用されていない。本発明により、プレビバクテリウム・アンモニアゲネスを宿主微生物として用いる遺伝子組換え技術が確立した点で、本発明はさらに有用である。

宿主微生物の組換え体 DNA による形質転換は (1) 培養細胞からのプロトプラストの調製、(2) 組換え DNA によるプロトプラストの形質転換処理、(3) プロトプラストの正常細胞への復帰再生と形質転換株の選択からなる工程にて行われる。具体的方法をプレビバクテリウム・アンモニアゲネスを用いた例により以下に示す。

(1) 培養細胞からのプロトプラストの調製

プロトプラストの調製は微生物を細胞壁の合成が阻害される条件下で増殖させ、この培養細胞に高強液中でリゾチームあるいはアクロモベ

薬耐性、栄養要求性などの性質を有する変異株、核酸関連物質生産性を有するまたは失った変異株など、いかなる菌株を用いててもよい。好適にはプレビバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 5872 や、この菌株を親株として変異誘導された核酸関連物質生産菌株たとえば 5'-イノシン酸生産菌プレビバクテリウム・アンモニアゲネス KY13184 (FERM P-3790)、5'-キサンテル酸生産菌プレビバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 21075、イノシン生産菌プレビバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 21477 などがあげられる。

微生物の形質転換法として、特開昭57-186492 にコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物の形質転換法について報告がある。しかし、本発明で宿主微生物として好適に用いることができるプレビバクテリウム・アンモニアゲネスは、プレビバクテリウム属に属しているものの、他のプレビバクテリウム属菌種、たとえばプレビバクテリウム・フラバムなどとは、

ブチダーゼなどを作用させて、細胞壁を溶解除去することによって行われる。栄養細胞を得るために使用する培地は、プレビバクテリウム・アンモニアゲネスが生育できるものであればいずれでも使用できる。たとえば NB 培地 (第 1 表) のような完全栄養培地や、G II 培地 (第 2 表) のような半合成培地などが使用できる。

第 1 表

粉末ブイヨン	20 g / l
酵母エキス	5 g / l
pH	7.2

第 2 表

グルコース	1.5 g / l
(NH ₄) ₂ SO ₄	8 g / l
尿 素	1.2 g / l
酵母エキス	1.2 g / l
K ₂ HPO ₄	0.5 g / l
K ₃ HPO ₄	0.5 g / l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1 g / l

特開昭63-248394(4)

$\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2 mg/l
$\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mg/l
$\text{Mn SO}_4 \cdot 4 - 6\text{H}_2\text{O}$	1 mg/l
ビオチン	0.1 mg/l
サイアミン塩酸塩	2 mg/l
バントテン酸カルシウム	1.0 mg/l
アデニン	1.0 mg/l
グアニン	1.0 mg/l
pH	7.2

この培地にプレビバクテリウム・アンモニアゲネスを接種し、20-40℃にて通気搅拌条件下で培養する。培地の吸光度(OD)を比色計にて経時的に測定し、菌の対数増殖期の初期(ODが0.1~0.15に達したとき)に細胞壁合成阻害剤を添加する。細胞壁合成を阻害する薬剤としては、ペニシリン、グリシンなどを使用することができる。これら薬剤の使用量は、微生物の生育を半ば抑制する濃度もしくはそれ以下が望ましく、ペニシリンの場合には培養液

中に0.1~2.0 µg/ml程度、またグリシンの場合には1.0~4.0 mg/ml程度の濃度になるよう添加する。薬剤添加後さらに培養を続け、数世代増殖させて栄養細胞を得る。

培養液から栄養細胞を集めし、培地および高張液にて洗浄したのち、それぞれの高張培地に懸滴し、溶菌酵素処理を行う。洗浄に用いる培地としては前記のNB培地、GIII培地などが使用でき、高張液としてはP3高張液(第3表)が使用できる。

第3表

NaCl	7.0 mM
MgCl_2	5 mM
CaCl_2	5 mM
N-トリス(ヒドロキシメチル)-メチル-2-アミノエタン-スルホン酸	2.5 mM
ソルビトール	1.6 M
pH	7.6

また高張培地としては栄養培地、半合成培地、最少培地などに高張化薬剤として0.25~0.6Mのショクロース、0.3~0.7Mコハク酸2ナトリウム、0.4~2.0Mソルビトールのいずれかを添加したもの、あるいはP3高張液などを用いることができる。溶菌酵素処理は、卵白リゾチームあるいはアクロモペプチダーゼなどをいずれも0.1~5.0 mg/ml程度の濃度となるように添加し、30~40℃にて5~20時間保持する。プロトプラストの生成は光学顕微鏡で観察することにより、球型の細胞として確認することができる。

このようにして調製したプロトプラストは、高張寒天培地上において生育してコロニーを形成し、栄養細胞に再生する。再生を行わせるためには、通常3日から20日間、20~40℃で保つ。高張寒天培地としては、栄養培地、半合成培地、最少培地などに0.25~0.6Mのショクロースまたは0.3~0.7Mのコハク酸2ナトリウムおよび寒天(ディフコ社製)14 g/l

を添加したものなどが用いられる。

(2) 組換えDNAによるプロトプラストの形質転換処理

プロトプラストの組換えDNAによる形質転換は、細胞がプロトプラスト状態を保持できる高張液中でプロトプラストと組換えDNAとを混合し、これにDNA取込み媒介作用のあるポリエチレンギリコール(PEG、平均分子量1,540~6,030)と2価金属陽イオンを加えて処理することによって行われる。高張条件を与える安定化剤としては、微生物のプロトプラストの保持に一般に使われるものでよく、たとえばショクロース、コハク酸2ナトリウム、ソルビトールなどを用いることができる。PEGの使用可能な濃度範囲は最終濃度で5~6.0%である。2価金属陽イオンとしては、たとえば Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Sr^{2+} などが最終濃度1~10.0 mMの範囲において効果的で、単独使用あるいは併用することができる。処理の温度は0~25℃が好適である。

(3) プロトプラストの正常細胞への復帰再生と形質転換株の選択

プロトプラストの正常細胞への復帰再生と形質転換株の選択は次のように行う。組換え体DNAを用いて形質転換処理したプロトプラストの再生は、前記のプロトプラストの再生と同様に高張寒天培地上において行う。形質転換株は組換え体DNAに由来する遺伝子が菌に付与する形質について選択することによって取得できる。この特徴的形質獲得に基づく選択は、高張寒天培地上で再生と同時にやってよい。また、一旦非選択的に再生させてから再生正常細胞を集め通常の低張寒天培地上で選択を行ってもよい。

形質転換株は通常の栄養培地に培養することにより、導入した組換え体DNAの形質を発現させることができる。組換え体DNAの導入により形質転換株に薬剤耐性などの性質が付与されている場合は、その性質にあわせて培地に薬剤を補給することもある。

尿素、ペプトン、N-エターミン、肉エキス、酵母エキス、コーンステーブリカ、カゼイン加水分解物、フィッシュミールあるいはその消化物などの窒素含有有機物、グリシン、グルタミン酸などの各種アミノ酸など種々のものが使用できる。無機物としてはリン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、硫酸マグネシウム、リン酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、炭酸カルシウムなどを用いることができる。さらに、用いる菌がアミノ酸、核酸、ビタミンなど特定の栄養素を生育に要求する場合には、培地にこれらの物質を適量添加するが、前記したような他の培地成分に伴って培地に供給されれば特に加えなくても良い。

培養は振盪培養あるいは通気搅拌培養などの好気的条件下に行う。培養温度は一般に20-40℃が経済である。培養期間は通常2-7日である。培地のpHはアンモニア水、尿素液、水酸化ナトリウム溶液などで中性付近に保つこ

このようにして得られた形質転換株を、发酵法による核酸関連物質製造の際に用いられる培養方法により培養することによって核酸関連物質を製造することができる。すなわち該形質転換株を炭素源、窒素源、無機物、アミノ酸、ビタミンなどを含有する通常の培地中、好気的条件下において温度、pHなどを調整しつつ培養を行えば、培養物中に核酸関連物質が生成蓄積するのでこれを採取する。炭素源としては、グルコース、フラクトース、シュクロース、グリセロール、澱粉、澱粉加水分解液、糊蜜、糊蜜加水分解物などの炭水化物、グルコン酸、ビルピン酸、乳酸、酢酸などの各種有機酸、グリシン、グルタミン酸、アラニン、アスパラギン酸などのアミノ酸など、該生産菌が資化可能なものであればいずれも使用可能である。窒素源としてはアンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウムなどの各種無機および有機アンモニウム塩、

とが望ましい。こうようにして培養物中に若量の核酸関連物質が蓄積する。培養終了後、イオン交換樹脂法、吸着法、沈殿法、抽出法などの単独または組合せにより、培養物から核酸関連物質を回収することができる。

次に実施例を示す。

実施例1

(1) *pu r F* の pCE53 へのクローニング

大腸菌の染色体DNAは、大腸菌K12株

(エシェリヒア・コリ ATCC 33525)

をバクトトリプトン(ディフコ社製) 1.0 g/l、

酵母エキス(ディフコ社製) 0.5 g/l、

NaCl 0.5 g/l を含み、pHを7.2に調整したL培地に植菌し、30℃で18時間培養後、得られた培養菌体からスマスのフェノール抽出法 [Smith, H.G.; メソッズ・イン・エンチモロジイ(Methods in Enzymology),

12, Part A, 545(1967)] に従い単離した。

pCE53はこのプラスミドを保有する大腸

菌K12株並株MM294(特開昭60-210994)

特開昭63-248394(6)

号公報参照)から、該公報記載の方法により分離精製した。

上記で調製した大腸菌K12株の染色体DNA 1.0 μgを1.0 mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(以下トリスと略す)-塩酸(pH 7.5)、1.0 mM NaCl、7 mM MgCl₂および6 mM 2-メルカプトエタノールを含む緩衝液(以下Y-100緩衝液と称する)4.0 μlに溶かし、2.4単位の制限酵素Pst I(宝酒造社製、以下特記しない限り制限酵素はすべて宝酒造社製)と2.0単位の制限酵素BamH Iを加え、3.7℃で1時間消化反応を行った。その後、6.5℃、10分間の熱処理により反応を停止させた。一方pCE53プラスミドDNA 3 μgをY-100緩衝液2.0 μl中に溶かし、1.2単位のPst Iと1.0単位のBamH Iを加え、3.7℃で1時間消化反応を行い、6.5℃、10分間の熱処理により反応を停止させた。両消化物を混合した後、2.0 mMトリス-

塩酸(pH 7.6)、1.0 mM MgCl₂、1.0 mMジチオスレイトールおよび0.5 mM ATPを含む緩衝液(以下T4 DNAリガーゼ緩衝液と称する)1.20 μlおよび3単位のT4 DNAリガーゼ(宝酒造社製)を加えりて、18時間処理した。このようにして得られたT4 DNAリガーゼ反応混合物を用い、pur F欠損によるヒポキサンチン要求性の大腸菌FL-46株をコーニン(Cohen)らの方法[Cohen et al.,: プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミイ・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) U.S.A., 69, 2110(1972)]により形質転換し、選択培地(グルコース2 g、Na₂HPO₄ 6 g、KH₂PO₄ 3 g、NaCl 0.5 g、NH₄Cl 1 g、MgSO₄·7H₂O 0.5 g、CaCl₂·2H₂O 1.5 mg、サイアミン塩酸塩4 mg、カザミノ酸2 g、レートリプトファン50 mg、カナマイシン50 mgおよび寒天16 gを水1 lに含みpH 7.2に調

整した培地)に塗布後、3.7℃で3日間培養することによりカナマイシン(5.0 μg/ml)に耐性で、かつ宿主が示すヒポキサンチン要求性が相補された形質転換株を得た。

この形質転換株からプラスミドをアンラムの方法(An, G, et al., ジャーナル・オブ・バクテリオロジイ(J. Bacteriol.), 140, 400(1979))により分離精製しPst Iなどの制限酵素で消化することによりプラスミドの構造解剖を行った。その結果、pCE53のPst I-BamH I DNA断片に大腸菌K12株の染色体DNA由来の約9 kbのPst I-BamH I DNA断片が挿入された組換え体プラスミドであることを確認し、このプラスミドをpEF12と名付けた。pEF12を用い、大腸菌FL-46株をコーニンらの方法により再形質転換したところ、カナマイシン耐性株として選択される形質転換株のすべてがヒポキサンチン非要求性となっていた。これらのことより、pEF12にpur Fがクロー

ン化されていることが確認された。

(2) プラスミドpEF12のプレビバタリウム・アンモニアゲネスへの導入

(i) にて分離精製したプラスミドpEF12をプレビバタリウム・アンモニアゲネスATCC5872の形質転換に供した。

形質転換は下記のようにして調製したATCC5872株のプロトプラストを用いて行った。ATCC5872株をNB培地で3.0℃、1.6時間振盪培養し、その種培養液0.8 mlをG四培地8 mlの入ったL字型試験管に接種し、モノー型振盪培養機を用いて3.0℃で振盪培養した。培地の吸光度を東京光電比色計にて経時的に測定し、対数増殖期の初期(培養時間約3時間、菌体濃度約10⁶個/ml)に0.3 U/mlになるようにベニシリソGを添加し、さらに3時間培養を続けた。培養液から菌体を集めしG四培地で洗浄後、2.0 mg/ml卵白リゾチーム、0.6 mg/mlアクロモペプチダーゼ含有P3高張液1 mlに再懸液し、3.0

特開昭63-248394(7)

てで16時間静置してプロトプラスト化した。このプロトプラスト懸濁液0.5mlを小試験管にとり2,500×g、10分間遠心分離し、TSMC緩衝液(1.0 mM MgCl₂、3.0 mM CaCl₂、5.0 mMトリス-塩酸、0.4 M シュクロース、pH 7.5) 1mlに再懸濁して遠心洗浄後、TSMC緩衝液0.1 mlに再懸濁した。この懸濁液にpEF12プラスミドDNA 1.0 μgを含むTSMC緩衝液0.1 mlを加えて混和し、次いでTSMC緩衝液中に20%ポリエチレンギリコール(PEG) 5.000(半井化学薬品社製)を含む液0.8mlを添加して混合した。10分後、GⅢ培地2mlを添加し、2,500×g、10分間遠心分離し上澄液を除去した。沈降したプロトプラストを1mlのGⅢ培地に懸濁してから、該懸濁液の0.2mlをカナマイシン200 μg/mlを含む高張寒天培地(GⅢ培地に0.5Mコハク酸2ナトリウム、1.4%寒天を含む)に塗布し、30℃で14日間培養し、培地上に生育して

リゾチームーアクロモベプチダーゼ液(12.5%シュクロース、0.1 M NaCl、0.05 M トリス-塩酸、3mg/mlリゾチーム、1mg/mlアクロモベプチダーゼ、pH 8.0)で1.0mlに懸濁し、37℃で4時間反応させた。反応液に5M NaCl 2.4ml、0.5 M EDTA(pH 8.0) 0.6ml、4%ラウリル硫酸ナトリウムと0.7M NaClからなる溶液4.4mlを順次添加し、緩やかに混和してから氷水中に16時間置いた。溶菌物全体を遠心分離管に移し、4℃で60分間69,000×gの遠心分離を行い上清液を回収した。これに重量百分率10%相当のPEG 5,000を加え、静かに混和して溶解後、氷水中に置いた。10時間後、1,500×gで10分間遠心分離してペレットを回収した。TES緩衝液5mlを加えてペレットを静かに再溶解してから、1.5mg/mlエチジウムプロマイド2.0mlを添加し、これに塩化セシウムを加えて静かに溶解し密度を1.380に合わせた。

くるカナマイシン耐性の形質転換株T-51を得た。得られた形質転換株は、プレビバクテリウム・アンモニアゲネスT-51(FERM BP-1332)として、昭和62年4月3日付で工業技術院微生物工業技術研究所(微研)に寄託されている。

(3) プレビバクテリウム・アンモニアゲネスからのプラスミドの調製

(2)で得られた形質転換株T-51(FERM BP-1332)からpEF12プラスミドを次のようにして単離、精製した。NB培地で30℃、16時間振盪培養し、その培養液4mlをGⅢ培地400mlに接種し、30℃で振盪培養した。対数増殖期の初期(菌体濃度1.0⁶個/ml)に0.3U/mlになるようにベニシリングを添加し、さらに5時間培養を続けた。培養液から菌体を集めしTES緩衝液(3.0 mM トリス-塩酸、5 mM エチレンジアミン4酢酸2ナトリウム(EDTA)、5.0 mM NaCl、pH 8.0)で洗浄後、

この溶液を20℃、105,000×gで40時間超遠心分離にかけた。この密度勾配遠心により共有結合で閉じられた環状のDNAは紫外線照射下に遠心チューブ中下方の密度の高いバンドとして見出された。このバンド部分を注射器で遠心チューブの側面から抜き取ることによってpEF12プラスミドDNAを含む液を分離した。次いで分離液を等容量のイソプロパノール(容量百分率、イソプロパノール:TES緩衝液=9:1(なおこのTES緩衝液は飽和溶解量の塩化セシウムを含む))で5回処理してエチジウムプロマイドを抽出除去し、かかる後にTES緩衝液に対して透析した。

こうして単離、精製したプラスミドDNAをPst Iなどの制限酵素で消化することによって構造解析を行った。その結果、(1)で確認したpEF12と同じ構造を有していることが確認された。

(4) プラスミドのイノシン生産性菌株への導入

特開昭63-248394(8)

と、該形質転換株の A P T a s e 活性の測定
イノシン生産能を有するブレビバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 21477 を
(2)と同様の方法でプロトプラスト化したのち
(3)にて単離、精製した組換え体プラスミド p E F 1 2 を用いて形質転換し、カナマイシン耐性の形質を有する形質転換株を取得した。

ATCC 21477 および形質転換株 ATCC 21477/p E F 1 2 の APTase の活性の測定は公知の方法 (J. H. Lewis and S. C. Hartman, メソッド・イン・エンチモロジイ (Methods in Enzymology), 51, 171-178 (1978)) を若干改変して下記のように実施した。

活性測定に供する菌株を、100mlのG III 培地を含む500mlの三角フラスコを用いて30℃、16時間振盪培養し、得られた菌体を超音波で破砕して溶胞液を調製した。これを6,000×g、30分間遠心分離して得た上清を粗酵素液として用い、30mMトリス-

塩酸(pH 8.0)、9mM MgCl₂、1.6mM フッ化カリウム (KF)、3mMホスホリボシルピロリン酸、1.2mMグルタミンからなる溶液0.3ml中で25℃、5分間反応させた。なおグルタミンを含まないものを对照実験とした。反応終了後、0.1mlの1.0M塩酸ナトリウム溶液、0.05mlの3mMピロリン酸ナトリウム溶液、0.1mlの0.1M塩化マンガン溶液を順次加えた後、1,590×g、5分間遠心分離してペレットを回収した。これに0.5mlの0.01M塩化マンガン溶液、0.1mlの1.0%アセトン溶液を順次加えて洗浄後、遠心分離してペレットを回収した。このペレットに1.0N硫酸1.0mlを加え、100℃、15分間加热した。冷却後、無機リン測定用アッセイキット（和光純薬社製）を用いてリンの定量を行い、グルタミン依存性の活性を測定することにより APTase 活性を求めた。第4表に活性測定結果を示す。

第 4 表

菌 株	APTase 活性 (μmole/min/mg タンパク)
ATCC 21477	8.2
ATCC 21477/pEF12	12.7

p u t - F を含む組換え体プラスミド p E F 1 2 が導入されたことにより、APTase 活性が1.5倍に増大しており、明らかに活性上昇効果が認められた。

(5) 形質転換株によるイノシンの生産

ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 21477 およびその形質転換株 ATCC 21477/p E F 1 2 のイノシン生産性を調べた。

両菌株を各々NB培地20mlを含む250ml容三角フラスコに一白金耳ずつ接種し、30℃、24時間培養して得た種培養液を、生産培地 (グルコース130g、KH₂PO₄ 10g、K₂HPO₄ 10g、MgSO₄·7H₂O 10g、コーンスチーブリカー

20g、CaCl₂·2H₂O 0.1g、FeSO₄·7H₂O 10mg、ZnSO₄·7H₂O 2mg、MnCl₂·4·6H₂O 2mg、ビオチン3.0μg、ビタミンB₁ 5mg、パンテン酸カルシウム1.0mg、ニコチン酸5mg、アデニン1.00mg、グアニン1.00mg、尿素4gを純水1ℓに含みpH 7.5に調整した培地) 20mlを含むバッフルプレート付250ml容三角フラスコに10% (容量比) の割合で植菌し、30℃で4日間、220rpm にて振盪培養した。培養中48および72時間目に別殺菌した尿素を2g/ℓの割合で添加し pH を調整した。培養終了後、培養物中のイノシン蓄積量をベーパークロマトグラフィーにより定量した。その結果を第5表に示す。

第 5 表

菌 株	イノシン (g / ℓ)
ATCC 21477	5.2
ATCC 21477/pEF12	9.4

特開昭63-248394(9)

purFを含む組換え体プラスミドpEF12を導入したことにより、顕著なイノシン生産性の改善が認められた。

実施例2

実施例1の(3)で単離、精製した組換え体プラスミドpEF12を用い、5'-イノシン酸生産能を有するプレビバクテリウム・アンモニアゲネスKY13184(FERM-P-3790)を、実施例1の(4)と同様の方法でプロトプラスト化したのち形質転換し、カナマイシン耐性の形質を有する形質転換株を得た。該形質転換株KY13184/pEF12をのAPTase活性の測定を実施例1の(4)と同様の方法で実施した。その結果を第6表に示す。また該形質転換株KY13184/pEF12を実施例1の(4)と同様にしてペーパークロマトグラフィーにより5'-イノシン酸を定量した。蓄積した5'-イノシン酸の量を第7表に示す。対照菌株として現株KY13184を用い同様に実施した。

を取得した。該形質転換株ATCC21075/pEF12のAPTase活性の測定を実施例1の(4)と同様の方法で実施した。対照としてATCC21075株を用い同様に処理した。結果を第8表に示す。

第8表

菌株	APTase活性 (μmole/min/mg DNA)
ATCC21075	3.9
ATCC21075/pEF12	14.7

purFを含む組換え体プラスミドpEF12が導入されたことにより、APTase活性の上昇が認められた。

次に該形質転換株ATCC21075/pEF12の5'-キサンチル酸生産能を調べた。プレビバクテリウム・アンモニアゲネスATCC21075およびATCC21075/pEF12をNB培地2.0mlを含む25.0ml容三角フラスコに各々一白金耳ずつ接種し、30℃、24時間培養して得た種培養液を実施例1の(5)と同じ組成の生産培地2.0mlを含む25.0ml容三角フラスコに1:0.3%（容量比）

第6表

菌株	APTase活性 (μmole/min/mg DNA)
KY13184	7.1
KY13184/pEF12	10.4

第7表

菌株	5'-イノシン酸 (g/l)
KY13184	20.1
KY13184/pEF12	24.9

pEF12が導入されたことにより、APTase活性の上昇、5'-イノシン酸生産性の改善が認められた。

実施例3

実施例1の(3)で単離、精製した組換え体プラスミドpEF12を用い、5'-キサンチル酸生産能を有するプレビバクテリウム・アンモニアゲネスATCC21075を形質転換した。形質転換は、ベニシリソ濃度を0.5U/mlとしてプロトプラストを調製する以外は実施例1の(2)と同様にして行い、カナマイシン耐性形質を獲得した形質転換株

の割合で植菌し、30℃で4日間、220rpmにて振盪培養した。培養中48および72時間目に別段菌した尿素を2g/lの割合で添加しpHを調整した。蓄積した5'-キサンチル酸をペーパーカロマトグラフィーにより定量した。結果を第9表に示す。

第9表

菌株	5'-キサンチル酸 (g/l)
ATCC21075	14.8
ATCC21075/pEF12	19.5

purFを含む組換え体プラスミドpEF12が導入されたことにより、5'-キサンチル酸の生産性改善が認められた。

発明の効果

本発明方法により、プリンヌクレオチド生合成に関与する酵素であるAPTaseの遺伝子を含む組換え体DNA、該組換え体DNAを保有させたコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物および該微生物を用いた核酸関連物質の製造法を提供することができる。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.